

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5: C12N 15/12, C07K 15/00 C12P 21/08, C12Q 1/68 C12N 1/21, G01N 33/53, 33/574 C12P 19/34

(11) Numéro de publication internationale:

WO 93/00430

(43) Date de publication internationale:

7 janvier 1993 (07.01.93)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00589

(22) Date de dépôt international:

25 juin 1992 (25.06.92)

A1

(30) Données relatives à la priorité:

91/07807

25 juin 1991 (25.06.91)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (SNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PERBAL, Bernard [FR/FR]; I, boulevard Beethoven, F-78280 Guyancourt (FR). MARTINERIE, Cécile [FR/FR]; 153, chemin de la Hunière, F-91120 Palaiseau (FR).

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES HYBRIDIZABLE WITH THE NOV GENE OF CHICKENS

(54) Titre: SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CAPABLES DE S'HYBRIDER AVEC LE GENE NOV DE POULE

(57) Abstract

Nucleotide sequences containing a concatenation of nucleotides which are hybridizable in stringent conditions (50 % formamide, 5XSC) with one or more sequences of the nov gene of chickens, wherein the cDNA of said gene comprises the nucleotide concatenation shown in the accompanying figure. These sequences may be used as probes for detecting complementary sequences to evaluate the development and/or differentiation of tumors.

(57) Abrégé

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide, 5XSC) avec une ou plusieurs séquences du gène nov de poule dont l'ADNc comporte l'enchaînement de nucléotides représenté sur la figure. Ces sèquences sont utilisables comme sondes de détection de

<u>a</u> ... CON CASE OF THE CONTROL OF THE CASE OF THE CONTROL TOT ACC CEA CHC AMC ACC AMA ACC ATT CAA CTT CAC TTC CCC TCT CCT CAC CCC AMA TTC CTA AMA AMC CCA ATC ATC TTC ATC AAT ACC

s. And desire alternative states of the stat

séquences complémentaires pour l'évaluation du développement et/ou de la différentiation de tumeurs.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AΤ	Autriche	FI	Finlande	MI.	Mati
ΑU	Australie	FR	France	MN	Mongolic
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinec	NL	Pays-Bas
RG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvēgo
BJ	Bénin	HU	Hongric	PL	Pologne
BR	Brésil	1E	Irlande	RO	Roumanic
CA	Canada	ΙT	Italie	RU	Fédération de Russie
CF	République Centraficaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG.	Congo	KP	République populaire démocratique	SE	Suède
CH	Suisse	•	de Corée	SN	Sénégal
CI.	Côte d'Ivoire	KR	République de Corée	SU	Union sovičtique
CM	Cameroun	LI	Licehtenstein	TD	Tchad
CS.	Tchécoslovaquie	LK	Sri Lanka	TG	Togo
DE	Allemagne	LU	Luxembourg	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MC ·	Monaco		
ES		MG	Madagascar		
	Espagne	1410			

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES, CAPABLE DE S'HYBRIDER AVEC LE GENE NOV DE POULE

L'invention a pour objet des séquences de nucléotides et les séquences d'acides aminés correspondantes. Elle concerne également l'obtention de ces séquences et leurs applications.

Il est admis depuis de nombreuses années que le auxiliaire induit par le virus néphroblastome myéloblastose aviaire (MAV) constitue un modèle animal de la tumeur de Wilms chez l'enfant. Bien que ces deux types de tumeurs aient des éthiologies différentes, aucun virus n'ayant été associé jusqu'à présent au développement du néphroblastome humain, on conçoit que l'étude, au niveau viro-induits, des néphroblastomes peut permettre de caractériser des paramètres difficilement accessibles dans le système humain.

Les études des inventeurs concernant de tels néphroblastomes aviaires induits par le MAV leur ont permis de caractériser chez la poule un gène embryonnaire appelé gène nov dont l'expression s'avère stimulée à des niveaux variables dans les tumeurs, mais qui est éteint dans les cellules de rein adulte normal.

En développant leurs travaux dans ce domaine, les inventeurs ont élaboré des outils leur permettant d'étudier l'expression de gènes homologues dans les tumeurs humaines et dans certains types cellulaires.

Ainsi, en clonant les séquences désoxyribonucléiques et un ADN complémentaire correspondant au gène nov des cellules normales de poule, les inventeurs ont établi la séquence nucléotidique partielle des ADN et la séquence nucléotidique complète de l'ADNc. Des sondes moléculaires spécifiques ont été établies sur la base de cette séquence et utilisées pour détecter la présence et l'expression de gènes homologues dans divers types cellulaires humains.

L'invention a donc pour but de fournir de nouvelles séquences de nucléotides d'un gène impliqué notamment dans les cellules tumorales.

Elle a également pour but de fournir des moyens pour l'isolement de ces séquences.

L'invention vise en outre les protéines codées correspondantes et les anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre ces protéines.

L'invention vise de plus l'utilisation de ces séquences, protéines et anticorps dans des applications biologiques, en particulier dans des tests de détection.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide 5 XSCC), avec une ou plusieurs séquences du gène nov de poule dont l'ADNC présente l'enchaînement de nucléotides (I), plus spécialement avec l'enchaînement (II).

Les enchaînements des séquences de nucléotides et de protéines auxquels il est fait référence dans la description et les revendications sont donnés en fin de description.

La séquence nucléotidique entière du clone d'ADNC nov de poule est formée de 1975 pb et comprend au moins 5 exons. Cette séquence comprend un cadre ouvert de lecture de 1,0 kb, codant pour une protéine potentielle de 32300 Da, allant du nucléotide 24 au nucléotide 1076. Ce cadre ouvert de lecture est suivi de 899 pb de séquences 3' non codantes qui contiennent deux signaux de motifs potentiels

de polyadénylation AATAAA en position 1914 et 1932. Ce gène nov de poule est surexprimé dans des néphroblastomes aviaires induits par MAV étudiés par les inventeurs.

Les expériences d'hybridation réalisées dans des conditions stringentes définies ci-dessus montrent que, de manière inattendue, des séquences homologues du gène noy de poule existent dans le génome humain.

Les séquences homologues isolées, chez l'homme ou l'animal, sont utilisables pour le criblage de banques réalisées à partir d'ARN-m, et permettent d'isoler des ADNC et ainsi d'identifier les autres exons des gènes de la même famille. Ces exons et les gènes qui les renferment, ainsi que les protéines codées correspondantes font également partie de l'invention.

On a indiqué ci-dessus que les expériences d'hybridation étaient réalisées dans des conditions stringentes, ce qui permet d'isoler des séquences présentant de fortes homologies avec celles des sondes.

Ces expériences peuvent être également réalisées dans des conditions non stringentes, réduisant en quantité de formamide, de sel et/ou le temps de lavage, comme décrit dans "A practical guide to molecular cloning", second edition, B. Perbal, John Wiley and Sons, New York, présenteront isolées alors séquences 1988. Les homologie moins forte que précédemment avec les séquences d'exons conduiront à l'identification des sondes et présentant moins de séquences communes.

Des séquences de nucléotides de l'invention sont plus particulièrement caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du

deuxième exon du gène <u>nov</u> de poule qui comprend la séquence nucléotidique (III).

Les lettres indiquées dans ces enchaînements présentent les significations conventionnelles figurant dans l'ouvrage de Perbal cité plus haut.

L'invention vise en particulier les séquences nucléotidiques comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 70 % avec le fragment de protéine, correspondant au deuxième exon du gène nov de poule, répondant à la séquence (IV).

Les séquences de nucléotides capables đe s'hybrider avec l'enchaînement (III) ci-dessus également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 600 pb , tel qu'obtenu à partir d'un sous-clone plasmidique, dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain. La carte de restriction enzymatique du recombinant, ainsi que celle du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question, sont représentées sur la figure 2A.

De telles séquences sont caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (V).

On notera la présence, dans ces séquences d'acides aminés rencontrées chez l'homme, d'une séquence consensus de liaison aux facteurs de croissance du type insuline (IGF). Cette séquence apparaît donc conservée chez l'homme.

Les différentes séquences évoquées ci-dessus comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (VI) suivant, correspondant au fragment Pst I mentionné plus haut, plus spécialement de l'enchaînement (VII).

L'enchaînement (VII) comporte 225 nucléotides avec 70 % d'homologie environ avec l'exon 2 du gène nov de poule.

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie du troisième exon du gène nov de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (VIII).

Des séquences du type défini ci-dessus comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 73 % environ avec le fragment de protéine potentiel du troisième exon du gène nov de poule répondant à la séquence (IX).

Ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 800 pb et d'un fragment PstI de 2 kb, tels qu'obtenus à partir d'un sous-clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain. La carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question est représentée sur la figure 2A.

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (X) d'acides aminés. On observera que cette séquence d'acides aminés peut être mise en évidence chez l'homme.

Ces séquences d'acides aminés comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XI), plus particulièrement de l'enchaînement (XII).

WO 93/00430

D'autres séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées cidessus, avec au moins une partie du quatrième exon du gène nov de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (XIII).

L'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 85 % avec le fragment de protéine correspondant au quatrième exon du gène nov de poule répondant à la séquence (XIV).

De telles séquences, capables de s'hybrider avec au moins une partie de l'enchaînement (XIII) ci-dessus, sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment HincII d'environ 400 pb, tel qu'obtenu selon les méthodes évoquées ci-dessus pour les autres fragments de restriction (voir figure 2B).

Selon un autre aspect, ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (XV).

Les séquences évoquées ci-dessus en rapport avec le quatrième exon du gène nov de poule comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XVI), correspondant au fragment HincII mentionné plus haut, plus particulièrement de l'enchaînement XVII.

D'autres séquences de nucléotides encore, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider avec au moins une partie du premier exon du

gène <u>nov</u> de poule qui comprend la séquence nucléotidique XVIII.

Selon au autre aspect, de telles séquences sont caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 30 % avec le fragment de protéine correspondant au premier exon du gène noy de poule répondant à la séquence (XIX).

De telles séquences sont également caractérisées en ce qu'elles codent pour l'enchaînement d'acides aminés (XX).

Les séquences définies ci-dessus en rapport avec le premier exon du gène <u>nov</u> de poule comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXI).

D'autres séquences nucléotidiques de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées ci-dessus, avec au moins une partie des troisième et quatrième exons du gène nov de poule qui comprennent la séquence nucléotidique (XXII).

De telles séquences sont encore caractérisées en ce qu'elles codent pour un fragment de protéine répondant à l'enchaînement (XXIII) suivant d'acides aminés.

Ces séquences sont également caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 700 pb tel qu'obtenu selon le protocole évoqué plus haut (voir figure 2B).

Des séquences du type de celles du fragment PstI de 700 pb ci-dessus sont plus particulièrement WO 93/00430 PCT/FR92/00589

caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider dans les conditions stringentes définies cidessus, avec au moins une partie du troisième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence (XXIV).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 60 % environ avec le fragment de protéine potentiel du troisième exon du gène noy de poule, ce fragment répondant à la séquence (XXV).

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXVI) d'acides aminés.

On observera que cette séquence peut être mise en évidence chez l'homme. Ces séquences comportent plus particulièrement au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXVII), plus particulièrement de l'enchaînement (XXVIII).

D'autres séquences de nucléotides de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent ou qu'elles sont formées par un enchaînement de nucléotides capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes évoquées cidessus, avec au moins une partie du quatrième exon du gène nov de poule, qui comprend la séquence nucléotidique (XXIX).

L'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'environ 80 % avec le fragment de protéine correspondant au quatrième exon du gène nov de poule, ce fragment répondant à la séquence (XXX).

Il s'agit en particulier de séquences comportant l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXXI).

Ces séquences sont formées par ou comprennent plus particulièrement l'enchaînement nucléotidique (XXXII).

Selon un autre aspect, l'invention vise une séquence recombinante comprenant l'une des séquences définies ci-dessus, le cas échéant associée à un promoteur capable de contrôler la transcription de la séquence et une séquence d'ADN codant pour les signaux de terminaison de la transcription.

L'invention vise également les séquences promotrices des gènes comportant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Elle vise en particulier au moins une partie de la séquence promotrice du gène nov humain dont les exons deux, trois et quatre sont donnés sur la figure 2A. Cette séquence promotrice qui correspond à l'enchaînement est localisée dans un fragment PsTI-Hind III de 2,2 kb et comprend les 283 nucléotides en amont au début du premier exon.

La séquence promotrice du gène nox humain est caractérisée en ce qu'elle comporte plusieurs séquences consensus de différents facteurs de transcription tels que NF1 (TGGCCTTCTGCCAATC), AP1 (TGACTAA) et Sp1 (GCCACTCCCC).

Elle comprend également une séquence de vingt répétitions de motifs TG qui peut constituer une séquence de polymorphisme, conférant un intérêt à cette séquence comme marqueur de polymorphisme.

WO 93/00430 PCT/FR92/00589

L'invention vise également la séquence promotrice du gène CTGF identifiée dans le fragment EcoRI - PstI de 700 pb environ, qui correspond à l'enchaînement (XXXIV).

Cette séquence est caractérisée en ce qu'elle comporte des sites de fixation des facteurs de transcription tels que SRF (CCTAAAAAGG), AP1 (TGAATCA), Sp1 (CCCGCCC), un site potentiel de fixation à la protéine Wt1 (CGCCCCGGC) et un site NF kappa B (GAGAGCCCC). Elle comporte également une TATA base (TATAAAA).

La séquence promotrice du gène <u>nov</u> de poule répondant à l'enchaînement $\left(\begin{array}{c} XXXY \end{array}\right)$ fait également partie de l'invention.

Cette séquence est contenue dans un fragment Smal-XhoI d'environ 1 kb qui comporte des séquences consensus de différents facteurs de transcription ainsi qu'une TATA base. Elle est caractérisée en particules en ce qu'elle comprend les sites suivants de fixation dy facteur Sp1 : GGGGGCGGGG, CCCCCGCCTC, Ap2 : CCGCAGGC, GGCGGGGC, GGGTCCC.

Elle comprend également un site de fixation du facteur NF kappa E2 (GGCAGGTGG) et du facteur NFKB (GGGAGTTTC).

Il est entendu que les bases des séquences de nucléotides considérées peuvent être dans un ordre différent de celui trouvé dans les gènes et/ou que ces bases peuvent être, le cas échéant, substituées. séquences correspondantes entrent dans le l'invention, dès lors qu'un fragment de ces séquences utilisé comme sonde donne une réponse caractéristique et non équivoque quant à la capacité de reconnaître présence de gènes codant pour des protéines telles que définies ci-dessus exprimées dans les cellules tumorales.

L'invention vise également en tant qu nouveaux produits les ARN correspondant aux différentes séquences définies ci-dessus et les séquences complémentaires des différents enchaînements nucléotidiques définis.

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants de clonage et d'expression capables de transformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression.

Les souches de microorganismes transformées ou transfectées entrent également dans le cadre de l'invention. Ces souches comportent l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant tel que défini précédemment.

Elle vise également les séquences d'acides aminés correspondant, selon le code génétique universel, aux séquences de nucléotides définies plus haut, et les protéines exprimées par les gènes comportant ces séquences.

Les séquences d'acides aminés homologues à celles codées par l'exon 2, qui contiennent le site de liaison aux facteurs de croissance IGF présentent un intérêt particulier, étant donné que le gène IGFII, qui se trouve chez l'homme sur le chromosome 11p15, est surexprimé dans certaines tumeurs de Wilms et pourrait donc être impliqué dans cette pathologie.

Dès lors que le motif consensus des protéines se liant à l'IGF joue une rôle important dans le développement des néphroblastomes en conjonction avec la dérégulation de l'expression d'IGFII, on mesure l'intérêt de la détection d'une expression anormale des protéines de l'invention qui renferment un tel motif.

WO 93/00430 PCT/FR92/00589

Les protéines de l'invention sont également caractérisées en ce qu'elles sont telles qu'obtenues par transformation de cellules hôtes au moyen d'un vecteur recombinant comme défini ci-dessus, mise en culture, dans un milieu approprié, des cellules hôtes transformées ou transfectées et récupération de la protéine à partir de ces cellules ou directement à partir du milieu de culture.

La production de ces protéines par un tel procédé fait également partie de l'invention.

Les protéines de l'invention et leurs fragments, qui peuvent être également obtenus par synthèse chimique, présentent avantageusement un degré de pureté élevé et sont utilisés pour former, selon les techniques classiques, des anticorps polyclonaux.

De tels anticorps polyclonaux, ainsi que les anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement un épitope des protéines ci-dessus, ou d'un fragment de ces protéines, sont également visés par l'invention.

L'invention vise en outre les applications biologiques des séquences de nucléotides, des protéines correspondantes et des anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Ces applications comprennent l'élaboration, à partir de fragments intragéniques purifiés, ou d'ARN correspondants, de sondes moléculaires pour rechercher la présence éventuelle de séquences de nucléotides apparentées au gène nox dans divers types cellulaires.

L'élaboration de ces sondes comprend, notamment, la dénaturation des séquences double-brin pour obtenir une séquence monobrin.

Les essais effectués pour détecter la présence de séquences complémentaires dans diverses tumeurs et tissus humains ont mis en évidence la grande spécificité de ces fragments intragéniques.

L'utilisation de ces sondes a ainsi permis de montrer que le gène renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus est exprimé dans plusieurss types de cellules humaines, y compris certaines tumeurs du rein.

L'invention vise donc des sondes de détection caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'une séquence de nucléotides définie ci-dessus.

Toute sonde ne se distinguant de la précédente, au niveau de sa séquence de nucléotides, que par des substitutions ou altérations de nucléotides n'entraînant pas de modification de ses propriétés d'hybridation avec le gène humain apparenté au gène noy de poule comme défini plus haut entre dans le cadre de l'invention.

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde comporte un nombre de nucléotides suffisant pour obtenir la spécificité requise et la formation d'un hybride stable.

Il est possible d'utiliser des fragments atteignant plusieurs kb, des résultats de haute spécificité étant cependant également obtenus avec des fragments plus cours d'environ 25 à 40 nucléotides.

Des sondes appropriées pour ce type de détection sont avantageusement marquées par un élément radio-actif ou tout autre groupe permettant sa reconnaissance à l'état hybridé avec la préparation renfermant les nucléotides à étudier.

Selon les techniques classiques, ces sondes sont mises en contact avec l'échantillon biologique à tester ou

leurs acides nucléiques, dans des conditions autorisant l'hybridation éventuelle de la séquence de nucléotides de la sonde avec une séquence complémentaire, éventuellement contenue dans le produit étudié.

On peut, par exemple, avoir recours à la méthode d'hybridation sur taches ou à la méthode d'hybridation sur réplique, selon la technique de Southern. Dans la première méthode, selon la technique classique, on dépose une quantité aliquote d'ADN dénaturé sur des membranes de nitrocellulose. La deuxième méthode comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADNs engendrés après traitement de l'ADN par des enzymes de restriction, le transfert après dénaturation alcaline sur des membranes appropriées et leur hybridation avec la sonde dans les conditions usuelles.

Ces sondes constituent des marqueurs tumoraux en permettant la détection précoce de l'expression du gène renfermant lesdites séquences nucléotidiques, qui normalement n'est pas ou peu exprimé dans les tissus normaux correspondants. L'invention fournit ainsi des moyens permettant d'évaluer le développement et/ou la différentiation tumorale.

La détection pour l'identification spécifique des ADN peut être également réalisée par des techniques d'amplification de l'ADN (PCR) telles que décrites dans les brevets US 4683202 et 4683195 au nom de Cetus Corportation.

Dans ces techniques, on utilise deux amorces d'environ une quinzaine de nucléotides comprises dans l'une des séquences de nucléotides définies ci-dessus et distantes d'environ 200 à 250 nucléotides. L'une des séquences est capable de se lier à une séquence de nucléotides de l'un des brins du fragment d'ADN à amplifier et située au niveau de l'une des extrémités de ce fragment, par exemple à l'extrémité 5'. L'autre séquence est capable

de se lier à une séquence de nucléotides du deuxième brin du fragment d'ADN à amplifier, et se trouve située au niveau de l'extrémité de ce fragment opposée à celle mentionnée plus haut (à l'extrémité 3', lorsque la première se trouver à l'extrémité 5').

L'invention vise également un procédé de détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique de séquences complémentaires de celles définies ci-dessus. Ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de l'échantillon biologique à étudier avec une sonde nucléotidique telle que définie plus haut dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre la sonde et la séquence de nucléotides recherchée,

- la détection du complexe d'hybridation.

Le cas échéant, on procède à une amplification préalable de la quantité de séquences de nucléotides susceptibles d'être contenues dans l'échantillon, à l'aide d'amorces, telles que décrites ci-dessus, susceptibles respectivement de se lier, d'une part à l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides.

L'utilisation d'un tel procédé représente une de temps gain et un augmentation de sensibilité considérable par rapport aux techniques classiques nécessitent souvent une technologie ne pouvant être mise en oeuvre que dans des services spécialisés. Il permet de plus une détection rapide et de grande spécificité des ADN et des différentes espèces d'ARNm de transcription. Ce procédé détection d'un remaniement constitue un moyen de

chromosomique au niveau des gènes qui codent pour les ARN noy ou CTGF sans avoir recours à des cultures cellulaires.

Pour la mise en oeuvre d'une telle méthode de dépistage <u>in vitro</u>, basée sur l'utilisation de sondes nucléotidiques, on a recours avantageusement à des nécessaires ou kits comprenant :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon l'invention,
- un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre la séquence à détecter et la sonde et, avantageusement,
- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.
- une quantité déterminée d'un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention,
- un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie des produits exprimés et l'anticorps et, avantageusement,
- des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés lors de la réaction immunologique.

La présence dans les protéines de l'invention d'une séquence de liaison aux facteurs de croissance du type insuline (IGF) est avantageusement mise à profit selon l'invention pour le dosage des protéines. A cet effet, on met en contact les protéines de l'échantillon biologique à étudier avec un IGF comportant un groupe marqué, par exemple un groupe radioactif ou sonde froide et on effectue le dosage de la quantité de produit fixé.

On rapporte ci-après à titre d'exemples non limitatifs le clonage et le séquençage du gène noy de poule, et de séquences de nucléotides répondant aux définitions données plus haut. Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 et 2,

- la figure l représentant la séquence d'ADNc du gène now de poule et celle de la protéine potentielle codée
- les figures 2 A et 2 B les cartes de restriction de fragments d'ADN de l'invention

Procédés de clonage moléculaire et séquençage rapportés dans les exemples :

purification des acides nucléiques : utilisation de dichlorométhane comme décrit dans V. Maloisel et al., Met. Mol. Cell. Biol. 1, 245-247, 1990.

Southern et Northern blots, et autres procédés de clonage : effectués selon les protocoles standards publiés par B. Perbal dans "A practical guide to molecular cloning, second edition, B. Perbal John Wiley and Sons, New York, 1988

purification des fragments d'ADN BamHI-HindIII de 7 kb et SacI de 6,6 kb : méthode Geneclean (Bio 101).

Sondes radioactives : préparées par nick translation en présence d' α dCTP 32p.

Séquençage des nucléotides : selon la méthode de terminaison de chaîne au didéoxy en présence d' α dATP 35s, de T7 polymérase ou de Séquenase (USB).

Exemple 1:

Isolement de l'ADNC du gène nov de poule

25 ng d'ADNc correspondant à de l'ARN poly A de fibroblastes d'embryons de poule de 13 jours sont ligaturés avec 1 µg de bras lambda gt10 pour préparer une banque d'ADNc de fibroblastes normaux de poule en utilisant le kit d'Amersham.

Après criblage avec une sonde cellulaire dérivée d'une tumeur, on purifie 7 clones, l'insert le plus long (1,9 kb) est purifié selon la méthode de Geneclean (BIO 101) et sous-cloné au site KpnI de Bluescript KS+ (Stratagène) pour générer le clone pClK.

Séquençage nucléotidique :

Le séquençage est réalisé par la méthode de terminaison de chaînes didéoxy-nucléotide en présence d' α 35S dATP et de polymérase T7 (Pharmacia) ou de Séquenase dans les conditions décrites par les fabricants.

Des matrices sont obtenues à partir des clones recombinants M13mp18 et M13mp19. Les amorces de séquençage proviennent de Biolabs, New England. Les compressions GC sont résolues en utilisant la déoxy-inosine (USB).

Caractérisation du gène cellulaire nov :

On effectue une analyse par Northern Blot d'ARN isolés de reins normaux, de fibroblastes d'embryons de poule (FEP) et de néphroblastomes en utilisant les sondes cellulaires dérivées d'une tumeur. La sonde HX1024 permet de détecter dans les FEP normaux une espèce d'ARNm de 2,2 kb dont l'expression est altérée dans tous les autres néphroblastomes. Le criblage d'une banque d'ADNc de FEP permet d'isoler un clone d'ADNc de 1,9 kb représentant l'ARNm de 2,2 kb exprimé dans les FEP normaux.

on a représenté sur la figure 1 la séquence entière nucléotidique de 1975 pb du clone d'ADNc de ce nouveau gène, surexprimé dans les néphroblastomes étudiés, appelé gène nov. Ce gène apparaît constitué de 5 exons. Un cadre ouvert de lecture de 1,0 kb codant pour une protéine potentielle de 32300 Da a été identifié du nucléotide 24 au nucléotide 1076. Ce cadre ouvert de lecture est suivi de 899 pb de séquences 3' non codantes qui contiennent deux motifs potentiels de signaux de polyadénylation (AATAAA) aux positions 1914 et 1932.

On a également indiqué sur cette figure les acides aminés potentiellement codés. Le polypeptide nov potentiel contient un noyau hydrophobe caractéristique d'un signal peptidique à son extrémité amino (avec 6 leucines). Cette protéine nov étant dépourvue d'autres régions hydrophobes présentes dans les protéines trans-membranaires, il est protéine nov sécrétée. La est qu'elle vraisemblable consensus GCGCCXXC des également motif le contient protéines liant les facteurs de croissance du type insuline (IGF) et un total de 39 résidus cystéine ne formant pas de cluster.

Exemple 2 : Isolement dans des cellules humaines de séquences de nucléotides apparentées au gène noy de poule.

On effectue un Southern blot de fragments d'ADN humain digéré par EcoRI avec le clone d'ADNc du gène noy de poule pClK. On opère dans les conditions stringentes rapportées par B. Perbal (voir référence ci-dessus).

On constate que quatre fragments EcoRI s'hybrident avec des séquences du gène <u>nov</u> de poule. Ces fragments comportent respectivement 15, 12, 8 et 5,6 kb.

Exemple 3 : Isolement de séquences de nucléotides apparentées au gène noy de poule.

A partir d'une banque d'ADN de placenta humain, on isole à l'aide de la sonde pClK radiomarquée deux groupes de clones lambda gtll recombinants.

La carte de restriction partielle de lambda Hu92 (qui correspond à trois clones se chevauchant) et de lambda Hu93 (qui correspond à deux clones se chevauchant) et celles des sous-clones plasmidiques pBH7 et p56 sont représentées sur les figures 2A et 2B.

Les séquences de nucléotides humaines homologues à celles du gène nov de poule sont localisées dans un fragment d'ADN de 7,0 kb BamHI-HindIII du clone Hu92 et celles appartenant au gène CTGF dans un fragment d'ADN de 6,6 kb SacI du clone Hu93.

Sur ces cartes, les enzymes de restriction sont désignées comme suit : B = BglII, P = PstI, K = KpnI, H = HindIII, S = SacI, E = EcoRI, X = Xba, B = BamHI et Hc = Hine II. Les blocs noirs représentent les régions exoniques humaines.

Le sous-clonage de ces fragments dans les vecteurs pUC18 et pUC19, appelés respectivement clones pBH7 et pS6 permet de localiser plus précisément les séquences homologues du gène nox de poule et les séquences du gène du CTGF. Les premières sont localisées d'une part dans un fragment d'ADN PstI de 600 pb (E2), d'autre part dans un fragment PstI de 800 pb (E3), et dans un fragment HincII de 400 pb (E4). La sonde pBH7 correspond au fragment HindIII-BamHI.

La localisation des premier, deuxième, troisième, quatrième et cinquième exons humains au GTGF sont indiquées sur la figure 2B (désignations respectives El, E2, E3, E4, et E5).

L'utilisation des fragments PstI d'ADN purifiés comme sondes dans des expériences d'hybridation Southern avec les fragments EcoRI de l'exemple 2 conduit à la seule détection du fragment EcoRI d'ADN de 12 kb avec PBO6 et du fragment EcoRI de 15 kb avec PSPO7 démontrant que les séquences de PBPO6 et PSPO7 correspondent à un sousensemble des exons noy de l'ADNC de poule.

Exemple 4 : Détection d'ARN du génome humain apparentés au gène noy de poule.

On rapporte dans le tableau suivant les résultats d'expériences d'hybridation Northern avec différents tissus et lignées cellulaires en utilisant comme sondes les enchaînements de formule VIII, XV et XVI ci-dessus homologues respectivement des exons E2, du gène nov de poule et E3 et E4 du gène CTGF (ces codes étant utilisés dans le tableau pour les désigner).

WO 93/00430 PCT/FR92/00589

TISSUS ET LIGNEES CELLULAIRES		so	NDES
	E2	E3-E4	kb de
	(nov)	(CTGF)	l'ARNm
.			
Moelle osseuse	+	+	(2,)
thymus (foetal)	+	-	(2,5) (⁷ ,4) (2,5)
Foie (foetal)	-	-	(2,5)
HEL	-	+	(2,5)
Cerveau (foetal)	+	_	(2,5)
	-	+	(7,4)
Neuroblastome 1	+	+	(2,5)
Neuroblastome 162	+	+	(2,5)
	-	+	(7,4)
Rein (foetal)	+	+	(2,5)
Nephroblastome Bou	nt	+	(2,5)
Tissu mammaire	nt	+	(2,5)
Tumeur mammaire gg	nt	+	(2,5)
Tumeur mammaire sc	nt	+	(2,5)
	+	+	(3,5)
·	-	+	(7,4)
SK-BR3	-	+	(2,5)
	+	+	(3,5)
	-	4-	(7,4)

poumon (foetal)	+	+	(2,5)
coeur (foetal)	+	+	(2,5)
lignée 293	+	+	(2,5)
 5	••		- .
MCF7	-	+	(7,4)
Carcinome embry test. 8	nt	+	(2,7)
		+	(7,4)
	•		
Teratocarcinome test. 10	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Teratocarcinome test. 11	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
Adenocarcinome U377	nt	+	(2,7)
	-	+	(7,4)
HL60	nt	+	(7,4)

nt = non testé

Les résultats obtenus montrent que le gène humain homologue du gène nox de poule et le gène CTGF appartenant à la même famille sont exprimés selon les tissus ou lignées sous la forme de différentes espèces d'ARN détectés soit par les deux sondes, soit par une seule d'entre elles.

WO 93/00430 PCT/FR92/00589

L'espèce d'ARNm de 7,4 kb exprimée par certains tissus et lignées n'apparaît reconnue que par la sonde PSP07.

Ces résultats indiquent que la régulation des gènes chez l'homme dépendrait de la spécificité tissulaire.

ENCHAINEMENT I

	SCECCESTAGACESCESSEACT ATS GAS ACS GGC GGS CAS GGS CTS CCC GTC CTG CTG CTC CTC CTC CTC CGG CCG TGC GAG GTG 95	95
	GGG CGC TGC CCC GCG GCG CGC TGC GCC CCG GGA GTG CCC GCC GTG CTG	185
	CGG CNG CGC GGC GNG NGC IGC ICC CCI CIG CIG CCC IGC GNG GNG AGC GGC GGC CIC INC	275
	GAC CGC GGC CCC GAG GAC GGC GGC GGC GGC	365
=1 11	GGG GAG ACG TTC CAG CCC AGG TGC TAC CAG TGC TGC CGG GAC GGG CAG ATC GGG TGC CTG CCC CGC TGC AAC CTG GGC CTG	455
1 1	CTC CCC GCC CCC GAC TGC CCC TTC CCG CGG AAG ATC GAA GTC CCC GGA GAG TGC TGC GAG AAG TGG GTG TGC GAC CCC AGG GAT GAA	545
= 1	CTC CTG GGA GGC TTT GCT ATG GCT GCA TAC AGA CAG GCC ACA CTT GGG ATA GAC GTG TCT GAT TCA AGT GCC AAT TGT ATT GAA	635
DΕ	ACA ACA GAA TGG AGT GCT TGT TCC AAA AGC TGT GGA ATG GGC TTT TCT ACC CGT GTT ACC AAC AGA AAT CAG CAG TGT GAG ATG GTG	125
RF	GAA AAC GAA GAG CCA TCT GAT AAG AAA GGA AAA AAA TGT ATC CAA ACA AAG AAA TCC	815
M	AAA GCT GTT CGT TIT GAA TAC AAG AAC TGC ACT GTG CAG ACT TAC AAA CCT CGT TAC TGT GGC CTC TGC AAT GAT GGG CGA TGC	908
⊃∟∕	ACC CCA CAC AAG ACC AAA ACG ATT CAA GTT GAG TTC CGC TGT CCT CAG GGC AAA TTC CTA AAA AAG CCA ATG ATG TTG ATT AAC	995
4C	AGT ANC ANT GCT TTC TTC CAG CCA TTA GAT CCC ATG TCT AGT GAA GCA AAA ATA TGAAATGTATA	1087
EMENT	AGGTGGCCCÄAANGGTATGTAGTTTGTACAAANCTTGACCCACAATCAGTGANTGTAATTAGCATATGTAANATATCTGAGATTTTTTTTTT	1206 1325 1444 1563 1682 1801 1920

185

TGC GGC GGG CGC TGC CCC GCG GGG CGG CGC TGC GCC CCG GGA GTG CCC GCG GTG CTG

ENCHAINEMENT II

275 365 545 635 125 155 TAC CCC GAG GAC GGC GGC GGC GGC ATC TGC ATG GTG CTG GAA GGG GAC AAC TGC GTG TTC GAT GGG ATG ATT TAC CGC S S GTG CTC CTG GGA GGC TTT GCT AIG GCT GCA TAC AGA CAG GCC ACA CTT GGG ATA GAC GTG TCT GAT TCA AGT GCC AAT TGT ATT GAA CAG ACA ACA GAA TGG AGT GGT TGT TGC TGT GGA ATG GGG TTT TCT ACC CGT GTT ACC AAC AGA AAT CAG CAG TGT GAG ATG GTG GGG CAG ACG ITC, CAG CCC AGC IGC AAG IGC ACC IGC CGG GAC GGG CAG AIC GGG TGC CIG CCC CGC IGC AAG CIG GGC CIG CIC CTC CCC GGC CCC CAC TGC CCC TTC CCG CGG AAG ATC GAA GTC CCC GGA GAG TGC TGC GAG AAG TGG GTG TGC CAC CCC AGG GAT CAC GCC TCC CGC TGC TGC GTG TGC GCC CGG CAG CGC GGC GAG NGC TGC TCC CCT CTG CTG CCC TGC GAC GAG AGC GGC GGC aag cag aca cea cit igc aig aig aga cci igi gaa aac gaa gag cca ict gai aag aaa gga aaa aaa igi aic caa aca aa כאכ כפכ פפכ

FEUILLE DE REMPLACEMENT

ENCHAINEMENT III

101 111 121 131 141 151 AGGIGAGGGG GCGTGCCCC GCCCTGCGG CGGGCGCTGC CCCGCGGAGC.	211 TGCCTGGTGT	271 AGCGGCGGCC	
141	201	261	321
CGGCGCTGC	CTGCGGCTGC	CTGCGACGAG	CATCTGCATG
131 GGCCCTGCGG	161 171 181 191 201 211 CGCCGCGCTG CGCCCGGGG GTGCCTGGACGG CTGCGGCTGC TGCCTGGTGT	221 241 241 251 271 271 CGCCGGCGAG AGCTGCTCCC CTCTGCTGCC CTGCGAGGAG AGCGGGGGGCG	281 291 301 301 321 TCTACTGCGA CCGCGCCCC GAGGACGCCG GCGCCCGG CATCTGCATG
121	181	241	301
GCGTGCCCCC	GTGCCCGCCG	AGCTGCTCCC	GAGGACGGCG
111	171	231	291
GCGGGAGGCG	CGCCCGGGA	GCGCGGCGAG	CCGCGGCCCC
101	161	221	281
AGGTGAGCGG	CGCCGCGCTG	GCGCCCGGCA	TCTACTGCGA

NCHAINEMENT IV

83	PRCAPGVPAV LDGCGCCLVC ARQRGESCSP LLPCDESGGL
73	ARQRGESCSP
63	IDGCGCCIVC
53	PRCAPGVPAV
4.3	ISGREAACPR PCGGRCPAEP PRC
33	/SGREAACPR

YCDRGPEDGG GAGICM

H

ტ

Ħ

ပ

Н

28

Ы

G

ĸ

വ	ĸ	Ø	တ	g
ပြု	۲ ح	, R	S	E⊣
Q 78	G 83	A 87	E 92	ø
വ	а	υ	Ω	Z
വ	Æ	>	ပ	S
ပ	ပ	H	വ	Д
ж _[L 9	ပ	ы 9	Ω
0.77	P 81	ر 8وز	L 90	Ø
E	വ	တ	Ω	လ
A	E	ပ	တ	æ
Æ	Ø	១	ပ	Ω
v 756	P 801	D 846	s 891	ပ
	V A A T Q R C P P Q C 771	V A A T Q R C P P Q C 771 771 786 P A T P P T C A P G V 831	7 A A T Q R C P P Q C 786 A T P P T C A P G V 831 G C S C C L V C A R 876	771 C P P 786 A T P P T C A P G V 816 G C S C C L V C A R 861 S C S D L E P C D E S 921

ပ

 α

ග

Ø

955 965 975 CTCCCTCTGC TGTTTGACCT CTTCTCCTGC AG

ENCHAINEMENT VI

405	465	525	585	645	705	765	825	865 875 885 ATCTGGAGCC ATGCGACGAG AGCAGTGGCC	945
GCTGGGCGTG	AAGAAAGICT	CACGAGCTTT	TGGGACAGTA	CCCCCATITG	CICGCCIGCC	CCTGCGACGC	TGTCTGGTGT		GGTAATCCTG
	455	515	575	625 635 645	695	755	815	875	935
	ATCTACAGCG	GTGTGCAGAG	CTCCATCTCC	TACTITGCCC GCCTIGGTGG CCCCCATITG	TTCTCCTTGT	GGGCCGGTGC	CTGCTCATGC	ATGCGACGAG	CATCTGCACG
385 395 GAGCGCGCTA TAAAACCTGT	435 445 455 465 GGGGAAGGCG AGAAAGTCT	475 485 495 505 515 CGTTTGGTAA AAGCGAGAGG GGAAAGCCTG AGCATGCAGA GTGTGCAGAG	565 CTTCCTGCTT		665 675 685 695 TCACTGCGTC TTCTGTCCCA GCTGAGTGGT TTCTCCTTGT	715 725 735 745 TCAGGICGC IGCGACICAG CGCIGCCCIC CCCAGIGCCC	795 805 GTGCGCGCG TGCTGGACGG	865 ATCTGGAGCC	. 905 915 925 935 TCGCAGCGCG GACCCCAGCA ACCAGACTGG CATCTGCACG
375	435	495	555	615	675	735	795	845	915
cgcgrcccAG	GGGGAAGGCG	GGAAAGCCTG	TTTGCCTGAC	CCCCCAAAGT	TTCTGTCCCA	CGCTGCCCTC	GTGCGCGCGG	GCGTGGCGAG AGCTGCTCAG	GACCCCAGCA
365 CCGGCTTGTG	425 ACCGGACCAG	485 AAGCGAGAGG	535 545 TGTCGCGA AAGCAGTGCC	605 CCTTAAGATG	665 TCACTGCGTC	725 TGCGACTCAG	, 775 785 CGCCGACCTG CGCCCCGGG		905 TCGCAGCGCG
375 365 375 CTGCAGCCTAGTG CGCGTCCCAG	415 ATCGGCAAGC	475 CGTTTGGTAA	535 TGTCTCGCGA	595 AGTGGCAÇAC	655 GTCACCGGGC	715 TTCAGGTCGC	, 775 CGCCGACCTG	835 GTGCCCGCCA	895 TCTACTGTGA

FEUILLE DE REMPLACEMENT

ŀ	TTA	
Ę	_	
2	2 2 3 3 3	
	R	
	2	

720 730 740 750 760 .770 GTCGCTGCGA CTCAGCGCTG CCCTCCCCAG TGCCCGGGCC GGTGCCCTGC GACGCCGCCG	830
760 GGTGCCCTGC	820
750 TGCCCGGGCC	810
740 CCCTCCCCAG	800
730 CTCAGCGCTG	790
720 GTCGCTGCGA	780

ACCTGCGCCC CCGGGGTGCG CGCGGTGCTG GACGGCTGCT CATGCTGTCT GGTGTGTGCC

CGCCAGCGTG GCGAGAGCTG CTCAGATCTG GAGCCATGCG ACGAGAGCAG TGGCCTCTAC

TGTGATCGCA GCGCGGACCC CAGCAACCAG ACTGGCATCT GCACGG

ENCHAINEMENT VIII

GTGCTGGAAG GGGACAACTG CGTGTTCGAT GGGATGATTT ACCGCAACGG GGAGACGTTC

CAGCCCAGCT GCAAGTACCA GTGCACCTGC CGGGACGGGC AGATCGGGTG CCTGCCCCGC

TGCAACCTGG GCCTGCTGCT CCCGGCCCC GACTGCCCCT TCCCGCGGAA GATCGAAGTC

CCCGGAGAGT GCTGCGAGAA GTGGGTGTGC GACCCCAGGG ATGAAGTGCT CCTGGGAGGC

TTTGCTATGG CT

ENCHAINEMENT IX

VLEGDNCVFD GMIYRNGETF QPSCKYQCTC RDGQIGCLPR CNLGLLLPGP DCPFPRKIEV 149

169 179
PGECCEKWVC DPRDEVLLGG FAMA

ENCHAINEMENT X

116				131	11					146				
929	GTA	GAG	GGA	GAT AAC 1	AAC	\mathtt{TGT}	\mathtt{GTG}	TIC	GAT	999	GIC	ATC	TAC	၁၅၁
Ø	>	M	G	Ω	z	ပ	>	[±4		ტ	>	Н	X	ĸ
161				176	9				5	1				
AGT		GAG	AAA	TTT	CAG	CCA	AGC	$_{ m TGC}$	AAA	$_{ m LIC}$	CAG	$_{ m IGC}$	ACC	T GC
တ	ບ	ы	×	FI O	Ø	_ك	လ	ပ	×	Ж	Ø	ပ	₽	ပ
206				22	1.				23	9				
AGA	GAT	999	CAG	ATT	299	TGT	\mathtt{GTG}	သည	၁၅၁	\mathtt{TGT}	CAG	CTG	GAT	GTG
ĸ	Ω	g	α	Н	ტ	ပ	>	വ	ĸ	ပ	Ø	ы	Ω	>
251				26	99				28	31				
CTA	CTG		GAG	CCI	AAC	\mathtt{TGC}	CCA	GCT	CCA	AGA	AAA	GLL	GAG	\mathtt{GTG}
ᆸ	H		ы	Ь	Z	ပ	д	Ø	Ъ	P R	×	>	ធា	>
296				31	 1				326	97				
CCT	GGA		\mathbf{TGC}		GAA	AAG	$^{\mathrm{TGG}}$	ATC	\mathtt{TGT}		CCA	GAT	GAG	GAG
). A	ଓ		ပ	ပ	ഥ	×	Z	Н	ပ	ტ		Ω	ഥ	ഥ
341														
GAT	TCA	CTG	GGA	299	CTT	ACC	CTT	GCA	ပ					
Ω							Н	A						

32

ENCHAINEMENT XI

60	120	180	240	300	360	420	
CACTGTATTG	TTCTAGCGGT	AATTTCAGCC	CCCGCTGTCA	AGGTGCCTGG	GAGGCCTTAC	AAATACAAAC	
50	110	150 160 170 180	220	280 290 300	350	410	
ATAGCTTCTT	TTCCCCAATA	TCGATGGGGT CATCTACCGC AGTGGAGAGA AATTTCAGCC	TGGGCAGATT GGCTGTGTGC CCCGCTGTCA	CCCAGCTCCA AGAAAGTTG AGGTGCCTGG	GATTCACTGG	AGTAGAGGGT	
20 GGGTTTTGGA ACATGCCCTC CAAATCTTAC	80 TITCCICITC CICITIGCIT ITCACTITGC	160 CATCTACCGC	220 TGGGCAGATT		320 330 340 GAAAAGTGGA TCTGTGGCCC AGATGAGGAG	400 GGCTGGTCAT	AA
30	90		210	270	330	390	450
ACATGCCCTC	CTCTTTGCTT		CCTGCAGAGA	AGCCTAACTG	rcrereeccc	ATATACCTAG	TGGATTTGAA AA
20	80	140	190 200 210	250 260 270 GCTGGATGTG CTACTGCCTG AGCCTAACTG	320	380 390 400	440
GGGTTTTGGA	TTTCCTCTTC	AACTGTGTGT	AAGCTGCAAA TTCCAGTGCA CCTGCAGAGA		Gaaaagtgga	GAGAAACTCA ATATACCTAG GGCTGGTCAT	TGCAATCTCT
10	70	130	190	250	310	370	430
AAAAGGACTT	TGTTCTTGTT	AGAGGGAGAT	AAGCTGCAAA	GCTGGATGTG	AGAGTGCTGT	CCTTGCAGGT	ATGAAGAATT

ENCHAINEMENT XII

5 E	C	G	വ	
175	235	295	355	
AGAGAAATTT	TGTGCCCCGC	AGTTGAGGTG	ACTGGGAGGC	
165	225	285	345	
ACCGCAGTGG A	AGATTGGCTG	CTCCAAGAAA	AGGAGGATIC	
155	215	275	335	
GGGTCATCT	AGAGATGGGC	AACTGCCCAG	GCCCAGATG	
145	205	265	325	
TGTGTTCGAT	GTGCACCTGC	GCCTGAGCCT	GTGGATCTGT	
125 135 145 155 165 . 175 GCGGTAGAGG GAGATAACTG TGTGTTCGAT GGGGTCATCT ACCGCAGTGG AGAGAAATTT	185 195 205 215 225 235 CAGCCAAGCT GCAATTCCA GTGCACCTGC AGAGATGGGC AGATTGGCTG TGTGCCCGGC	245 245 295 295 295 275 285 295 TGTCAGCTGG ATGTGCTACT GCCTGAGCCT AACTGCCCAG CTCCAAGAAA AGTTGAGGTG	305 345 355 CCTGGAGAGT GCTGTGAAAA GTGGATCTGT GGCCCAGATG AGGAGGATTC ACTGGGAGGC	
125	185	245	305	365
GCGGTAGAGG	CAGCCAAGCT	TGTCAGCTGG	CCTGGAGAGT	CTTACCCTTG CAG

ENCHAINEMENT XIII

583 593 603 613 623 633 GCATACAGAC AGGAGGCCAC ACTTGGGATA GACGTGTCTG ATTCAAGTGC CAATTGTATT	643 653 663 673 683 693 693 693 693	703 743 753 753 743 753 743 753 6TTACCAACA GAAATCAGCA GTGTGAGATG GTGAAGCAGA CACGACTTTG CATGATGAGA
623	683	743
ATTCAAGTGC	GAATGGGCTT	CACGACTTTG
613	673	733
GACGTGTCTG	AAAAGCTGTG	GTGAAGCAGA
603	663	723
ACTTGGGATA	TGCTTGTTCC	GTGTGAGATG
593	653	713
AGGAGGCCAC	CAGAATGGAG	GAAATCAGCA
583	643	703
GCATACAGAC	Gaacagacaa	GTTACCAACA

ENCHAINEMENT XIV

193 203 213 223 243 243 AYRQEATLGI DVSDSSANCI EQTTEWSACS KSCGMGFSTR VTNRNQQCEM VKQTRLCMMR

233 PCENEEPSDK

ENCHAINEMENT XV

AAC TCC OFTA GAA GTC TCT GAC TC V E V S D E 179

OGG TGG ACA GCA TGC TC E W T A C E 224

CGG GTC ACC AAT AGG AA R V T N R P 269

CGG CTC TGC ATG GTG CC R L C M V F ACA GAT AAG T D K 254
I GAG ATG CTG AAA CAG ACT CC
E M L K Q T 1
299
A CAA GAG CCA GAG CCA AC
Q E P E Q P ACA O F E A T L (
164

TGC ATT GAA CAG ACC A(
C I E Q T (
209

GGT ATG GGG TTC TCC A(
G M G F S (
254 GCT TAC AGG CC A Y R 1 149 AGT GTC AAC T' S V N 194 AAG AGC TGT G K S C 239 K S C 239 R Q C TGT GAA (

ENCHAINEMENT XVI

60	120	180	240	300	360	420
TTCCAATCCT	GGCCAGAAGC	CCACAGAGTG	ATAGGAACCG	AACAAGAGCC	AGGTAATGGC	CGGAGAGAGC
10 20 30 40 50	100 110 120	160	190 200 210 240 240 240 230 230 240 CACAGCATGC TCCAAGAGCT GTGGTATGGG GTTCTCCACC CGGGTCACCA ATAGGAACCG	290 300	350	410
ATCAGAGTCG AATGAGACCC AGTTTCTAAT AATGGCTGAA AAGGACCACT TTCCAATCCT	TATACATCCC ATAGCTTACA GGCCAGAAGC	TGTCAACTGC ATTGAACAGA		CGGCCCTGTG AACAAGAGCC	CCCATCCTGA	CACTCTGTGA CGGAGAGAGC
40	100	160	220	280	340	400
AATGGCTGAA	TATACATCCC	TGTCAACTGC	GTTCTCCACC	CTGCATGGTG	GAGGAAACCT	GTCACTGTTG
30	90	150	210	270	330	390
AGTTTCTAAT	TGTCTTTATT	CTGACTCAAG	GTGGTATGGG	AGACTCGGCT	TAGGAGCCTG	GCTTCAGAAA
20	80	140	200	260	310 320 330	370 380 390 400 CTTGTGTCCT TGGAGCCTGG GCTTCAGAAA GTCACTGTTG
AATGAGACCC	CTAATATGGC TGTCTTTATT	GTAGAAGTCT	TCCAAGAGCT	ATGCTGAAAC	AGAGCAGCCA ACAGATAAGG TAGGAGCCTG	
10	70	130 140	190	250	310	370
ATCAGAGTCG	CACATTGATC	CACCCTAGGA GTAGAAGTCT	GACAGCATGC	TCAATGTGAG	AGAGCAGCCA	CTTGTGTCCT

430 AGCTATAGCG GGGAG

ENCHAINEMENT XVII

163	223	283	
CAACTGCATT	CTCCACCCGG	CATGGTGCGG	
153	213	273	
ACTCAAGIGT	GTATGGGGTT	CTCGGCTCTG	
143	203	263	GATAAG
GAAGTCTCTG	AAGAGCTGTG	CTGAAACAGA	
133	193	253	313
CCTAGGAGTA	AGCATGCTCC	ATGTGAGATG	GCAGCCAACA
113 123 163 GCTTACAGGC CAGAAGCCAC CCTAGGAGTA GAAGTCTCTG ACTCAAGTGT CAACTGCATT	173 183 193 203 213 223 6AACAGACCA CAGAGTGGAC AGCATGCTCC AAGAGCTGTG GTATGGGGTT CTCCACCCGG	233 243 253 263 273 283 CTCACCAATA GGAACCGTCA ATGTGAGATG CTGAAACAGA CTCGGCTCTG CATGGTGCGG	293 303 313 CCCTGTGAAC AAGAGCCAGA GCAGCCAACA GATAAG
113	173	233	293
GCTTACAGGC	Gaacagacca	GTCACCAATA	CCCTGTGAAC

ENCHAINEMENT XVIII

33 43 53 63 73 83 TATGGAGAÇE GECEGEGEGE AGGGGCTGCC CGTCCTGCTG CTGCTCCTGC TCCTCCTCG

GCCGTGCGA

ENCHAINEMENT XIX

METGGGGGLP VLLLLLLLLR PCE

ENCHAINEMENT XX

285

ATG GCA ACC CCG GGG TTC GTT CCA CTT CCC CAC CCA GCC GAT CTC

M A T P G F V P L P H P A D L

330

330

CCC CCT CCT CCC TGC ACT GCA GCC AAC CGG CTT

P P P C T A A N R L

ENCHAINEMENT XXI

294 334 344 344 344 344 344 344 ATGGCAACCC CGGGGTTCGT TCCACTTCCC CACCCAGCCG ATCTCCCCCC TCCTCCCTGC

ACTGCAGCCA ACCGGCTT

ENCHAINEMENT XXII

;	365	455	545		633	725
ć	נט	CTG	GAA		£ 55	
	ן אר ר	ວ ວຽງ	GAT G			ATG GTG
T T		CTG		ڔ	;	3AG
T.	?	AAC	CCC AGG	AAT	!	TGT (
999] 	TGC	GAC	ပ္ထ		CAG
TIC GAT GGG A		292 222	s Gre rec	TCA AGT GCC	;	T CAG
TG T	Ç	2 2	TGG GT	AT TC	;	AGA AAT
TGC GTG	ָ ֖֖֖֖֖֓֞ ב	יוני ניוני	λĞ	S TCT GAT	, C	٠ د
AAC	Ċ,	2	8	G T	V	2
GGG GAC	מדע פ		ဋ	A GAC		
GAA GG	CGG CA		פאס זכנ	GGG ATA G	ACC CGT	GAT AAG
CTG G	GAC G	ر د د	j S	A CTT G	TCT A	TCT G
TG CTG	ပ္ပ	ຸ່	,	AC.	TTT	
	TGC	STC.		ည	၁၁၁	GAA GAG
	TGC ACC	ANG ATC GAA	Č	5 5 5 5	TGT GGA ATG	C GAA
	CAG TC	AG AT	ć	מאט אפע	GT GG	GAA AAC
	TAC	CGG A	ر م ر	-	AGC T	TGT G
	AAG	၁၁	ď,		AAA	CCI
	n TGC	C TTC	S GCT		JCC	AGA
	ברה אפנ	TGC CCC	CCT ATG G	ě	191	G ATG
ز	ر د د	3,VC	TTT G	٤	אפן פרן	TGC ATG
1	:	222	200	Ų.	551	CTT 1
200	2	ဥ္ဌ	CGA	5		6 52
2 242 252	i	သည် ည	C CTG	A ACA		G ACA
אאכ מכ		CTG CTC	GTG CTC	CAG ACA		AAG CAG
_		_	G	O		«

FEUILLE DE REMPLACEMENT

39

ENCHAINEMENT XXIII

Ω	I	, P	T	R	I	P	D	A	L	D	V	. R	V	P
48				6	53				•	78				
Ω.	С	L	T	s	A	s	P	T	P	L	F	P	S	s
93				10	80				13	23				
s	P	A	K	D	G	A	P	С	I	F	G	G	T	V
138				1.5	53				10	58				
Y	R	s	G	E	s	F	Q	S	S	C	K	Y	Q	С
183				19	98				2:	13				
т	С	L	D	G	A	V	G	С	M	P	L	С	S	М
228				24	43				25	58				
ם	V	R	L	P	s	P	D	С	P	F	P	R	R	V
273				28	88				30	03				
ĸ	L	P	G	ĸ	С	С	E	E	W	V	С	D	E	P
318				33	33				34	16				
K	D	Q	T	V	L	G	P	A	S	R	V	S	R	V
363				37	78				39	93				
F	L	*	V	R	V	V	I	L	S	Q	G	G	S	P
408				42	23				43	88				
N	С	Α	D	R	T	G	E	I		Y	P	G	V	D
453				46	8				48	33				
н	G	V	С	V	L	С	S	R	S	L	P	T	G	R
498				51	L3				52	28				
н	v	W	P	R	P	N	Y	D		S	Q	L	P	G
543				55	58				57	73				
P	D	T	E	W	s	Α	С	s	K	T	С	G	М	G
588				60	23									
y	S	T	R	V	T	N	D	И	Α					

ENCHAINEMENT XXIV

CTGCGTG	TTCGATGGGA	VTGATTTACCG	CAACGGGGA	SACGTTCCAGO	CCAGCTGCA	CTGCGTGTTCGATGGGATGATTTACCGCAACGGGGAGACGTTCCAGCCCAGCTGCAAGTACCAGTGCACC
	320	300	370	380	390	400
190	200	210	220	230	240	250
TGCCGGG	ACGGGCAGAT	rcesersccrs	SCCCGCTGC	AACCTGGGCCT	GCTGCTCCC	TGCCGGGACGGGCAGATCGGGTGCCTGCCCGCTGCAACCTGGGCCTGCTGCTCCCCGGCCCCGACTGCC
	420	430	440	450	460	470
CCTTCCC	CCGGAAGATC	CCTTCCCGCGGAAGATCGAAG-TCCCCGGAGAGTGCTGCGAGAAGTGGGTGTGCGAC	GGAGAGTGC	rgcgagaagtg	GGTGTGCGA	O
	490	200	510	520	530	

ENCHAINEMENT XXV

11 YRNGE		VCD-PR	170	EGDNCV VCD-PR 170	FUGMLYRN 110	GETFOPSCK 120	YQCTCRDGQI 130	GCLPRCNLGL 140	LLPGPDCPFF 150	PRKIEVPGECCEKW 160
----------	--	--------	-----	-------------------------	-----------------	------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-----------------------

ENCHAINEMENT XXVI

,	100	GKCCEEWVCDE
ć	06	PFPRRVKLP
C		MDVKLPSPDC
70	SAWCOMPT OF	SOUTE POST
09	SCKYOCTCL	
20	VYRSGESFOS	!
40	DGAPCIFGGT	PR

41

ENCHAINEMENT XXVII

1 CC 5 18 33 3 . CAG ATC CCA ACT CGC ATC CCT GAC GCT CTG GAT GTG AGA GTG CCC 78 CAA TGC CTG ACC TCT GCA TCC CCC ACC CCT CTC TTC CCT TCC TCT 108 10 TCT CCA GCC AAA GAT GGT GCT CCC TGC ATC TTC GGT GGT ACG GTG 153 168 TAC CGC AGC GGA GAG TCC TTC CAG AGC AGC TGC AAG TAC CAC TGC 183 ACG TGC CTG GAC GGG GCG GTG GGC TGC ATG CCC CTG TGC AGC ATG 15 243 258 GAC GTT CGT CTG CCC AGC CCT GAC TGC CCC TTC CCG AGG AGG GTC 288 AAG CTG CCC GGG AAA TGC TGC GAG GAG TGG GTG TGT GAC GAG CCC 333 348 318 AAG GAC CAA ACC GTC CTT GGG CCT GCC TCG CGG GTG AGT CGA GTC 378 393 20 TTC CTC TAA GTC AGG GTC GTG ATT CTC TCC CAG GGA GGG AGT CCT 423 438 AAC TGT GCC GAC CGA ACG GGG GAA ATA CCT TAT CCA GGC GTT TTA 468 483 CAT GGT GTT TGT GTG CTC TGC TCT CGC AGC TTA CCG ACT GGA AGA 25 498 513 CAC GTT TGG CCC AGA CCC AAC TAT GAT TAG AGC CAA CTG CCT GGT CCA GAC ACA GAG TGG AGC GCC TGT TCC AAG ACC TGT GGG ATG GGC 603 588 ATC TCC ACC CGG GTT ACC AAT GAC AAC GCC TC

ENCHAINEMENT XXVIII

.. ..

190 200 210 220 230 240 250 TGCCTGGTCCAGACA-CAGAGGCGCTGTTCCAAGACCTGTGGGATGGGCATCTCCACCCGGGTTA 260 CCAA	ENCHAINEMENT XXIX	GCTTTGCTATGGCTGCATACAGACGCCACACTTGGGATAGACGTGTCTGATTCAAGTGCCAAT 570 590 600 610 620 TGTATTGAACAGACACAGAATGGAGTGCTTGTTCCAAAAGCTGTGGAATGGGCTTTTCTACCCGTGTTA 630 640 650 660 670 680 690	ENCHAINEMENT XXXI	70 80 TEWSACSKTCGMGISTRVTNDN	ENCHAINEMENT XXXII 130. 140 150 160 170 180 CTGCTCTCGCAGCTTACGAAGAAGACAGTTTGGCCCAGACCCAACTATGATT-A-GAGCCAAC 0 200 210 220 230 240 250 CTGGTCCAGACA-CAGAGTGGAGCCCTGTTCCAAGACCTGTGGGATGGCATCTCCACCCGGGTTA
210 CAGAGTGGAGCGC	S S	CATACAGACAGGA(580 ACAGAATGGAGTG(650	r XXX	TEWSACSKSCGMGFSTRVTNRN 210 220	ENC 140 TTACCGACTGGAAC 210 CAGAGTGGAGCGCC
190 200 TGCCTGGTCCAGACA- 260 CCAA		GCTTTGCTATGGCTG 570 TGTATTGAACAGACA; 630 CCAA	ENCHAINEMENT	TEWSACSKSCG 210	130 CTGCTCTCGCAGC 0 200 CTGGTCCAGACA~(

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 1

120 ATTAGTCCAG	180 GACAGGGACA	240 TTTCCCTTAT	300 AGGACTCCCT	360 AAAGTCCTCT	420 GAATAGCAAT	480 ATTTTCCCTG	540 TTGCCAATTT	580 590 600 TGGAACACTT GGCCGATGCT CTTTGCCTCC
	170 GGGCCTAAGA	230 AAGGATCATT	290 ATTGCCTCTG	350 TCCTTCCAGT	410 AATCAAAACT			590 GGCCGAIGCI
	160 TTTTAAAGTT	220 AGAAGATTGG	280 CTAGATCCCA	340 CATCACAGCA	400 CATCTCTTGC	460 AATCCTTGTC	520 GAGCTAGCCC	580 TGGAACACTT
	150 TTCCTGGAAC	210 TCATAAAGTA	270 CCICCICICI		390 GTTTGGTTTC	450 TTGACATGTT	510 TTTCCAAGAA	570 TATTCATGCT
			260 TCCTGTTGGC		380 ACTAGTTCAA	440 CAGTGACTTC	500 CACCCCACTC	560 TATCTGAGTC
70 ACCATGAGGT	130 GGTGAACCCA	190 TTCCTTCTGT	250 GTGGAAGTAA	310 GTACCATTCC	370 TTTCGCAAAA	430 TTTACACTTG	490 TCACCACTCC	550 CTCCTTGTTC
	80 90 100 110 TCTAACTAAT CCCCATACTT CACCTTCCTT GTCCCCATTG ATTAGTC	CCCCATACTT CACCTTCCTT GTCCCCATTG ATTAGTC 150 160 170 TTCCTGGAAC TTTTAAAGTT GGCCTAAGA GACAGGG	90 100 110 CCCCATACTT CACCTTCCTT GTCCCCATTG ATTAGTC 150 160 170 TTCCTGGAAC TTTTAAAGTT GGGCCTAAGA GACAGGG TCATAAAGTA AGAAGATTGG AAGGATCATT TTTCCT	CCCCATACTT CACCTTCCTT GTCCCCATTG ATTAGTC 150 160 170 TTCCTGGAAC TTTTAAAGTT GGGCCTAAGA GACAGGG TCATAAAGTA AGAAGATTGG AAGGATCATT TTTCCCT 270 280 290 CCTCCTCTCT CTAGATCCCA ATTGCCTCTG AGGACTC	90 100 110 CCCCATACTT GACCTTCCTT GTCCCCATTG ATTAGTC 150 160 170 TTCCTGGAAC TTTTAAAGTT GGGCCTAAGA GACAGGG TCATAAAGTA AGAAGATTGG AAGGATCATT TTTCCCT CCTCCTCTCT CTAGATCCCA ATTGCCTCTG AGGACTC CTATGTGAAA CATCACAGCA TCCTTCCAGT AAAGTCC	90 100 110 CCCCATACTT CACCTTCCTT ATTAGTC 150 160 170 TTCCTGGAAC TTTTAAAGTT GGGCCTAAGA GACAGGG TCATAAAGTA AGAAGATTGG AAGGATCATT TTTCCTT CCTCCTCTCT CTAGATCCCA ATTGCCTCTG AGGACTC CTATGTGAAA CATCCACAGCA ATTGCCTCTG AAAGTCC CTATGGTTTC CATCTCTTGC AAAAAACT GAATAGC	100 110	100 110

(suite)
fragment l
xxxiii :
ENCHAINEMENT

660 TCTACCAAGA	720	CIGIATITI	780 TAGGCCAAAT	830 CTTTTTCTTA: AACTTTTATT	900 GACATTTGTT	
650 TANAATGCTG	710	GCTCAGGAAT	770 GAGGCATCAT		890 ATGTGTCATG	GAGGTACC
640 650 660 CAAAGTACAT TAAAATGCTG TCTACCAAGA	700	GCCACCACCA GAGAATCCTA CTGAGTGGGT CAAGACTGGG GCTCAGGAAT CTGTATTTT	730 740 750 760 770 780 780 700 770 780 780 770 780	790 810 820 GGCTTACAAA ACCTATCAGT TTTTTTTTTTAT	850 860 870 880 890 900 TCAAGTICAG GGGAAATGTG CAGGTITGTT TACACAGGAA ATGTGTCATG GACATTTGTT	910 920 930 940 SUGREGAGATTA TITCATCGC CAGGIATIAA GCCIGGIACC GAGGIACC
630 TGCTCCATIT	069	CTGAGTGGGT	750 ATTCGATCTG	810 TTTTTTGTTT	870 CAGGTTTGTT	930 CAGGTATTAA
620 TGCTTCTAGT	089	GAGAATCCTA	740 ATGCTGGTTG	800 ACCTATCAGT	860 GGGAAATGTG	920 TTTCATCGCC
610 620 630 CCATTAGCAG IGCTICTAGT IGCICCAIIT	670	GCCACCACCA	730 NACAAAATAC	790 GGCTTACAAA	850 TCAAGTICAG	910 GTGCAGATTA

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 2

60	120	180	240	300	360	420	480	540	600	660
AAGCCTATCA	ATCTCTAGTT	AGAGGCTTGG	TTGAGGTGAC	GCCTTTGATT	CTCTAGAATT	CAAAGCAACT	AGTGTGGGGG	GCTCCCTTTT	TGCCCGGTGA	CTCATTTCTT
50	110 120	170	230	290	350	410	470	530	590	650
CCACCCTCCA	GAACTGTTTC ATCTCTAGTT	CAGAACTATT	TAGAAGGGGC	TCCGCAAGCT	TCTTTTAAA	TGTTTTTTC	CCAGTGTTGA	CAGTAAAACT	TGAAAGCGGA	CAGTTTCTTC
40	100	160	220	280	340	390 400	460	510 520	580	630 640 650 AAGGGTCAGC CAGTTTCTTC
CICCCACCCI	GAGTGCAAAT	TCAAAGAAAG	GAGAATTATC	CCTGGCCCCT	GCCATTTGTT	TTTCCTTAAA AAGTGTTTTT	AGGGCAGCA	AAACAATGTC ACCTTTGGAG	AATCATITCT	
30	90	150	210	270	330		450	510	570	630
CTTCTCCCTG	TCCTACTCAA GAGTGCAAAT	CTCATTTACC	AGGCTGCCGA	CAGAGGCAGA	TGAGGTAGAG		TAGTTCTCCT	AAACAATGTC	ATGCCCCAGC	AAGGGTCAGC
10 20 30 40 50 60 CATTAGTTAT TTTCCCGAT CTTCTCCCTG CTCCCACCCT CCACCCTCCA AAGCCTATCA		130 140 150 160 170 AAGTTTGAGT ACTACTCAGT CTCATTTACC TCAAAGAAAG CAGAACTATT	240 230 240 240 220 230 240 TAGTGGTTTC AGGCTGCCGA GAGAATTATC TAGAAGGGGC TTGAGGTGAC	250 280 270 280 CTCATCATCT GCGGGTGTTG CAGAGGCAGA CCTGGCCCCT	310 320 330 340 350 360 TCCTTCATGC TGGGGACAGA TGAGGTAGAG GCCATTTGTT TCTTTTTAAA CTCTAGAATT	380 CCTGTATAAT	430 440 450 460 470 480 ATCCTCAAAA GAGCTGGGCA TAGTTCTCCT AGGGGCAGCA CCAGTGTTGA AGTGTGGGGG	500 TAAATCCTTC	550 560 570 580 590 600 TCCCATGAGA GATGACAAGC ATGCCCCAGC AATCATTTCT TGAAAGCGGA TGCCCGGTGA	610 GAGAAGGATT TGATTTGCTG
10	70	130	190	250	310	370	430	490	550	610
CATTAGTTAT	ATTTGAAGAG TAGGTAAATG	AAGTTTGAGT	AAGTGTGTCA	CTCATCATCT	TCCTTCATGC	ACATCACAGG	ATCCTCAAAA	GAAACTGTTC	TCCCATGAGA	GAGAAGGATT

ENCHAINEMENT	XXXIII	:	fragment	2	(suite)
--------------	--------	---	----------	---	---------

	780 AGCAGGTGCT	840 TTTATGTGTG	900 AACCTG	960 AATTTTGCCA	1020 ATTCCCTTCC	1080 TTTCTCTCCT	1140 TAAACGGTGA	CCCCTGCAG
JACII TAGA			890 TTTTATTTCT AACAAACCTG					
	770 GGTCTGCTAC	830 TGATGTTTTC	TTTTAT	950 GAGTCAAAAG	TTTTT	CTTTCT	ATGAGT	TTCTGC
GT GGT TGAAC	760 TCTCACATTT	820 TTTTATTTA	880 TGTGTTTTAC	940 AGAAGGATTA	1000 CATATCGATT	1060 ACACTTTTCT	1120 AACACATTCA	1180 ACCCTGGCC
CCCTGGCTGG AGGTTTTGAT GGTGGTGATG GTGGTTGAAC TGAACCCACT TAGAAAACTG	750 AGGTGTGCCG	810 GATTTCTTTG	870 TGTGTGTGT	930 GAGTGAAGCT	990 CACCTCCTGA	1050 CAACACACAC	1110 CCTCCCTCTC	1170 TCATGACTAA
AGGTTTTGAT	740 CTGGACTCTC	800 CTTCTGCCAA	850 TGTGTGTG TGTGTGTG	920 GTTTAAGACT	980 AGCATTCCCC	1050 1060 1060 cccrccccc caacacaca acactrific	1100 GCTTCTCTCC	1150 1160 1170 1180 CAAACTTGC TCATGACTAA ACCCCTGGCC
9917991777	730 TCAAAGGTTT	790 TCAAGGCTTT	850 TGTGTGTGTG	910 TGACCTTGGG	970 TTTGGCCAAT	1030 CCCTGCCACT	1090 TTCCTCCCTT	1150 CAAACTTGCA

ENCHAINEMENT XXXIII : fragment 3

120	180	240	
CTTCCAGGAG	TCGGAACTCC	CACGCAGGCC	
110	170	230	TGCC
GGCGAAGCAA	GGTCCTGGCC	CACACAGGCA	
100	160	220	250 260 270 280 CGGGGGGGGCACC CACAGCCAAT TGCC
CCTGGGAGAA	GCGAGCCCTG	CCAGTCGCCA	
90	150	210	270
GTGTCTTCGT	ACGCGCTCGA	CTGGGAAAAG	GAGCAGCACC
80	140	200	260
GGGAGTGGTG	TTTCCTTCCC	TCCCCACCCT	GCCCTAAGGA
70	130	190	250
GAGGATGGTG	GAAACGGGCG	ACCCAGCCCC	
	80 90 100 110 GGGAGTGGTG GTGTCTTCGT CCTGGGAGAA GGCGAAGCAA CTTCCAC	GAGGATGGTG GGGAGTGGTG GTGTCTTCGT CCTGGGAGAA GGCGAAGCAA CTTCCAGGAG 130 140 150 160 170 180 GAAACGGGCG TTTCCTTCCC ACGCGCTCGA GCGAGCCCTG GGTCCTGGCC TCGGAACTCC	70 80 90 100 110 120 GAGGATGGTG GTGTCTTCGT CCTGGGAGAA GGCGAAGCAA CTTCCAGGAG 130 140 150 160 170 180 GAAACGGCG TTTCCTTCC ACGCGCTCGA GGTCCTGGCC TCGGAACTCC 190 200 210 230 240 ACCCAGCCC TCCCCACCCT CTGGGAAAAG CCAGTCGCCA CACGCAGGCC

ENCHAINEMENT XXXIV

		CCCGA	510 GGCCGAGAGC	500 CAGCCGCCCC	490 AGCTCGACGG
480 TCCACCCTCC	450 460 470 480 CTTCCGCTGA GAGGAGACAG CCAGTGCGAC TCCACCCTCC	460 Gaggagacag		430 CCCAAACTCA CACAACAACT	430 CCCAAACTCA
420	400 410	400	390000000	370	370
GGCCGCCCGC	CCGGAGCGTA TAAAAGCCTC	CCGGAGCGTA		TCCATTCAGC TCATTGGCGA	TCCATTCAGC
360	350	340	330	320	310
TTGTGTAGAC	ATGTCCCTGT	Aatgegagga	GGTGGGGAGG	GAGGCAGGAA	GTGAGTTGAT
300	280	280	270	260	250
TCAATCCGGT	TGAGTGTCAA GGGGTCAGGA	TGAGTGTCAA	GGAGGAATGC	TTTTTCAGAC	GTGTGCCAGC
240	230	220	210	200	190
GCGAGCTGGA	TTTTTTTCT	TTTCCTTTTT	CGCTTTTTTT	GGAAATACTG	ATTTGGTGCT
180	160	160	150	130	130
AAAAATTCT	GTGCGAAGAG GATAGGGAAA AAAAATTCT	GTGCGAAGAG	ATCAGGAGTG	TGTGTTTATA AATGATATGA	TGTGTTTATA
120	110	100	90	80	70
TAATTGCCAG	AAATAAGAAA	TTCGAAAAAG	GGCAAACTTA	GACAGAACAG	TATGTCAGTG
60	30 40 50	40	30	20	10
AAAAAGGATG	GCTGTTTGCC TCTTCAGCTA CCTACTTCCT	TCTTCAGCTA	GCTGTTTGCC	AGGAATICCI	CGAATTTTT

ENCHAINEMENT XXXV

60 ATGGAGTGTG	120 GAAGCAGCTG	180 TCTTTAAAAA	240 ATCAGTGATA	300 ATCAGGAACA	310 320 330 340 350 360 ATTITITIC TCCAAAAAT TGGTGAGGTA CTGCCACAGT CTGCCCAGCG AGGTGAATC	370 380 390 400 410 420 420 ACATELETT AGAIGING GAGAIGITEA GGAAACGIGI AGAIGIGGCA CIGAGGGAIG IGGITIAGIG
40 50 60	110	160 170 180	230	290	350	410
CACTACAAGA CATCGAGGCC ATGGAGTGTG	TGTTTTATTG	CTCAGGGAAA ACATTATTGC TCTTTAAAAA	GCTCCCAGGT	CAGTTTGGAT	CTGCCCAGCG	CTGAGGGATG
40	100	160	220	280	340	400
CACTACAAGA	CTGGAGCACA	CTCAGGGAAA	GrcGGCCTCT	AGGGGAGITI	CTGCCACAGT	AGATGTGGCA
30	90	150	210 220 230 240	270	330	390
ITGGGCCCCT	GGTGAGGAGT	TCCGGAGAGG	TGAGGTGGAG GTCGCCTCT GCTCCCAGGT ATCAGTGATA	AAATTATGCC	TGGTGAGGTA	GGAAACGIGI
20	70 80 90 100 110	130	190	250 250 270 280 290 300 GGATGAGAGG GAACTGTCTT AAATTATGCC AGGGGAGTTT CAGTTTGGAT ATCAGGAACA	320	380
GTGTTCAGTT	TCCAGAGAAG GGCACGAGGI GGTGAGGAGT CTGGAGCACA TGTTTATTG	AGGAAGTTGG GATTGTTCAG TCCGGAGAGG	TCCCTGGAAG GAGGTTGTGG		TCCAAAAAT	GAGATGTTCA
10 20 30	70	130	190	250	310	370
GTCGAGTGCT GTGTTCAGTT TTGGGCCCCT	TCCAGAGAAG	AGGAAGTTGG	TCCCTGGAAG	GGATGAGAGG	ATTTTTTTC	

ENCHAINEMENT XXXV (suite)

470 TAGCGATCTT TCCAGTCATA	540 CCGCAGGCTT	600 6006666766	660 031 032 032 032	720	GTCCCTACCG	780 GGCGGGTCAG	
470 TAGCGATCTT	530 CGGAGCAGAC	590 GCCGGGCACC	650 GGCTCCAGCT	710	9999999999	760 770 780 CCGCCAGAGC CGAGCGGCGC GGCGGGTCAG	
460 TAGATTAGCT	520 CCGGCCCCAG	580 CGCGGGCAGG	640 GGCCCTGCCC	700	AGGGGGGGCG	760 CCGCCAGAGC	
450 ATGGTTGGAC	510 TCCTAAGGCG	570 CGCGTCGGGA	630 CGGAGCGTAG	069	GGGCGTGAGG	750 AATGGCTTTG	
430 440 450 460 AGAATGGTAG GGATGGGTTG ATGGTTGGAC TAGATTAGCT	490 530 510 520 530 ACGATCCTGT GATCCTACGA TCCTAAGGCG CCGGCCCCAG CGGAGCAGAC	550 560 570 580 590 600 cAGCCCCGGACC GCCGGGCAGG	610 620 630 640 650 660 TGGCGGAGCN CAACGGGGAG CGGAGCGTAG GGCCCTGCCC GGCTCCAGCT CCCCGCCTCC	089	GTCCCGCGCT GCCGGTGGCG GGGCGTGAGG AGGGGGGGCG GGGGGGGGGG	730 740 750 GCCTCTATAT AAGCGGCCGC AATGGCTTTG	CT
430 Agaatggtag	490 ACGATCCTGT	550 CAGCCCCGGA	610 TGGCGGAGCA	0.09	GTCCCGCGCT	730 GCCTCTATAT	790 ACGGCCGGGA CT

- 1/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce qu'elles renferment un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans des conditions stringentes (50 % de formamide, 5XSCC) avec une ou plusieurs séquences du gène nov de poule dont l'ADNc présente l'enchaînement de nucléotides (I) et plus spécialement avec l'enchaînement (II).
 - 2/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement de nucléotides capable de s'hybrider, dans les conditions stringentes de la revendication 1, avec au moins une partie du deuxième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique (III).

15

30

- 3/ Séquences de nucléotides selon la revendication 2, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine renfermant une séquence ayant une homologie d'au moins 70 % avec le fragment de protéine correspondant au deuxième exon du gène noy de poule, ce fragment présentant la séquence d'acides aminés (IV).
 - 4/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 600 pb tel qu'obtenu à partir d'un sous-clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain, la carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique étant représentée sur la figure 2A.

5/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications l à 4, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une séquence d'acides aminés présentant l'enchaînement V.

5

10

15

6/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications l à 5, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie du l'enchaînement nucléotidique (VI), plus spécialement de l'enchaînement (VII).

7/ Séquences de nucléotides selon la revendication l, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication l, avec au moins une partie du troisième exon du gène nov de poule qui comprend la séquence nucléotidique (VIII).

8/ Séquences de nucléotides selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 70 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au troisième exon du gène noy de poule répondant à la séquence (IX).

25

9/ Séquences de nucléotides selon la revendication 7 ou 8, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une partie d'un fragment PstI d'environ 700 pb, tel qu'obtenu à partir d'un sous clone plasmidique dérivé d'un clone recombinant isolé d'une banque d'ADN de placenta humain, la carte de restriction enzymatique du clone recombinant ainsi que celle du sous-clone plasmidique dérivé renfermant la séquence nucléotidique en question étant représentées sur la figure 2A.

35

30

10/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisées en ce qu'elles

comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (X) en acides aminés.

Séquences de nucléotides selon l'une caractérisées ce qu'elles en à 10, revendications 7 de l'enchaînement partie moins une comportent au nucléotidique (XI), plus particulièrement, l'enchaînement nucléotidique (XII).

5

- 12/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formées par, ou qu'elles comprennent, un enchaînement capable de s'hybrider, dans les conditions stringentes données dans la revendication 1, avec au moins une partie du quatrième exon du gène nov de poule, qui comprend l'enchaînement (XIII).
 - la nucléotides selon 13/ Séquences de qu'elles caractérisées en ce sont 12. revendication capables de coder pour le fragment de protéine ayant une homologie d'au moins 86 % avec le fragment de protéine potentiel correspondant au quatrième exon du gène <u>nov</u> de poule répondant à l'enchaînement (XIV) en acides aminés.
- 14/ Séquences de nucléotides selon la 25 revendication 12 ou 13, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XV) en acides aminés.
- 15/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent l'enchaînement nucléotidique (XVI).
- 16/ Séquences de nucléotides selon la 35 revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du

premier exon du gène <u>nov</u> de poule qui comprend la séquence nucléotidique (XVIII).

17/ Séquences de nucléotides selon la revendication 11, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 30 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au premier exon du gène noy de poule, ce fragment présentant l'enchaînement (XIX) en acides aminés.

5

10

15

20

- 18/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 16 ou 17, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XX) en acides aminés.
- 19/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXI).
- 20/ Séquences de nucléotides selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont capables de s'hybrider, dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie des troisième et quatrième exons du gène nov de poule qui comprennent la séquence nucléotidique (XXII).
- 21/ Séquences de nucléotides selon la 30 revendication 20, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIII) en acides aminés.
- 22/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 21, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement capable de s'hybrider dans les conditions stringentes définies dans la revendication 1, avec au moins une partie du troisième

exon du gène <u>nov</u> de poule qui comprend la séquence nucléotidique (XXII).

23/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant une homologie d'au moins 60 % environ avec le fragment de protéine potentiel correspondant au troisième exon du gène noy de poule répondant à la séquence (XXIII) en acides aminés.

24/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIV) en acides aminés.

25/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 24, caractérisées en ce qu'elles comportent au moins une partie de l'enchaînement nucléotidique (XXV), plus particulièrement, l'enchaînement nucléotidique (XXVI).

26/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent un enchaînement capable de s'hybrider dans les conditions stringentes données dans la revendication 1 avec au moins une partie du quatrième exon du gène nox de poule, qui comprend l'enchaînement de nucléotides (XXVII).

30

35

5

10

15

20

25

27/ Séquences de nucléotides selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont capables de coder pour le fragment de protéine ayant une homologie d'au moins 86 % avec le fragment de protéine potentiel correspondant au quatrième exon du gène noy de poule répondant à l'enchaînement (XXVIII) en acides aminés.

28/ Séquences de nucléotides selon la revendication 26 ou 27, caractérisées en ce qu'elles comportent l'information génétique pour coder pour une protéine ayant la séquence (XXIX) en acides aminés.

5

29/ Séquences de nucléotides selon l'une des revendications 26 à 28, caractérisées en ce qu'elles sont formées par ou qu'elles comprennent l'enchaînement nucléotidique (XXX).

10

30/ Les ARN et séquences complémentaires des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 29.

15

31/ Vecteurs recombinants de clonage et d'expression, capables de tranformer une cellule hôte appropriée, comportant au moins une partie d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression dans la cellule hôte.

20

32/ Souches de microorganismes transformées ou transfectées, caractérisées en ce qu'elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 ou encore un vecteur recombinant selon la revendication .

25

33/ Les protéines correspondant aux séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 30.

30

34/ Les anticorps polyclonaux et monoclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement une protéine selon la revendication 33, ou un fragment d'une telle protéine.

35

35/ Sonde de détection, caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie des séquences de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 30.

36/ Procédé de dépistage <u>in vitro</u> de la présence éventuell dans un échantillon biologique de séquences de nucléotides complémentaires de celles selon l'une quelconque des revendications 1 à 30, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact de l'échantillon biologique avec une sonde nucléotidique selon la revendication 35 dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé entre ladite sonde et ladite séquence de nucléotides,

- la détection du complexe d'hybridation, et

15

20

10

5

- le cas échéant l'amplification, avant l'étape de mise en contact, des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 30 susceptibles d'être l'aide d'amorces à l'échantillon, contenues dans d'une part à susceptibles respectivement de se lier, l'extrémité 5' d'un brin de ladite séquence de nucléotides et, d'autre part, à l'extrémité 3' de l'autre brin de ladite séquence de nucléotides,

37/ Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage <u>in vitro</u> de la présence éventuelle dans un échantillon biologique de séquences complémentaires des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité déterminée d'une sonde nucléotidique selon la revendication 35,
- un milieu approprié à la formation d'une
 réaction d'hybridation entre la séquence à détecter, et la sonde, et, avantageusement,

- des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation formés entre la séquence de nucléotides et la sonde lors de la réaction d'hybridation.

38/ Procédé de dépistage <u>in vitro</u> de la présence dans un échantillon biologique des protéines selon la revendication 33, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de l'échantillon avec un anticorps selon la revendication 34, dans des conditions permettant la production d'un complexe immunologique formé entre tout ou partie des protéines et cet anticorps, et

- la détection du complexe immunologique.

15

10

5

39/ Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage <u>in vitro</u> de la présence éventuelle de protéines selon la revendication 21 dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité déterminée d'un anticorps selon la revendication 33,
- avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre au moins une partie d'une protéine et l'anticorps et, avantageusement,
- des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre au moins une partie de la protéine recherchée et l'anticorps lors de la réaction immunologique.
- / Procédé de détection dans un échantillon biologique de protéines selon la revendication 33, ou de leurs fragments, caractérisé par la mise en contact des protéines de l'échantillon, ou de leurs fragments, avec un IGF portant un groupe marqueur et le dosage de la quantité de produit fixé.

5

41/ Utilisation en tant qu'amorces dans des techniques d'amplification d'ADN, de type PCR, de deux amplimères d'environ 15 nucléotides, compris dans l'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, et distantes de 200 à 250 nucléotides environ, l'une des séquences étant capable de se lier à l'extrémité 5' d'un brin de la séquence à amplifier et la deuxième séquence à l'extrémité 3' de l'autre brin.

_	
고	
5	
2	
_	

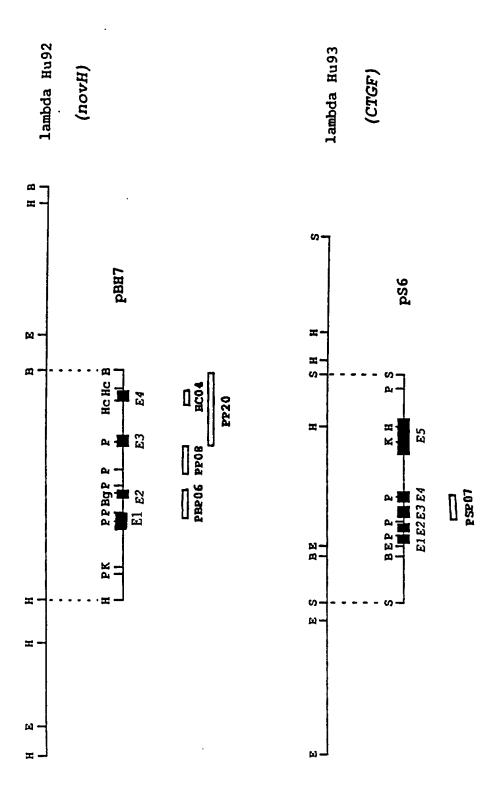
		95	185	275	365	455	545	635	725	815
ب اندودورو اندودورو		cac <u>T</u> crc, E ∨ ♠	CIG	II II II	ည်း	crc L	GAA E	GAA	GIG V	rcc s
		GAG.	GTG V	u H	TAC	၊ ႘ၟ ၑ		ATT		AAA ×
	mRNA	වූල	။ ပ္ပ	။ ဗို့ မျ	ATT	្រក្ស	1 8g 4			AAG 1 K
		ည် မှ	ည္သ	ပ္တမ	ATG	AAC	ည္တမ	-	_	
£	nov	ეე დ	GIG <	။လင္သိုင္င	99. 110.99	၊ ဗ္ဗို့	_		CAG 7	CAA 1
X.		CTC	ğ 01	1 6 m 1	GAT D	၁၅	ပ္ထို့	_	CAG	ATC (
ATANG		CIC	ပ္ပည္	1 8 01	TIC) ည 🛶 ၊				
		CIC	၁၁ 🛂	၊ ဗ္ဗို့တြ။	GIG > 1		_		AGA 1	AAA 7
		CTG	ဋိုက္ခ	၂ ပ္ပ 🏣။	မ္မို္		_	ICT (N N	-
		C C	ည္က	CTG L	AAC	ပ္ပ ပ ။	-	•	ACC 1	၌ဖ
3		CT J	ပ္ပို မျ	ព្រះ	GAC	AIC	ပ္ဆိုတ္ပါ		GTT >	_
GCTU CATA		CT T	ည် မျ	r L	ပ္ပိ ဇ ။	5 O.			ပြီ မျ	AAG []
8		55 7	GAG	၂၈ ၂	SA B B B	ပ္တ ပ ။		ວ ວ) H H	-
		> Circ	ပ္ပံ 🗷 🛭	်ဋိတ္ပ၊	ຄຸວ	S = 11	_	CTT (TCT 1	
		ပ္တြ	ပ္ပ 📶) si k	일 >	ည် 🗷	ပ္ပ 🏭	ACA (FIT	_
Đ		81-1	ပ္မွတ္၊	SAG BE	ATG M	ဂ္ဂ်ီ(O)။	-	7 225	ဂ္ဂ ဇ ၊၊	_
carred heere		99	ပ္ပ် ဧ။	ပ္တမ္း) H H H	GAA	GAG (ATG (_
100		CAG	ဗ္ဗ ဗ ။			ဋိတ္ပ။		CAG	SGA 1	
5		ဗ္ဗ ဗ	ပ္ပ်ပ္ပ	5 au 8					គ្គិ©ា	
		ပ္ပ	ဂ္ဂိတ္ပ်				ပ္ပို 🕿 🛭		AGC 1	<u>@</u>
		၁ဗ္ဗ	ည	ÿ∢π ξ) ၁၅ ၁၅		ပ္သိ မှ ၊၊			CCT
		ACG	წ ~ →	မှု ပြုမျှ	ဗ		TIC		၂ လ ၂	AGA R
ğ		GAG	ပ္သ	5 - S	g ပ l	၂ လ	ပ္ပ	AIG M		ATG M
ocake crasa		ATG H	ဂ်္ဂ ကြ	5 1 5	<u>}</u>		ဂ္ဂ်ံတြ။			ATG 1
ů G						S 0 1		TTT (F	AGT (-
		ນນວງ				TIC II		ပ္ပံ ဖ		CII
i‱i •o		GCGCCGGTAGACGCCCGGGACT *	GAG	ပ္ပမ္မ			ပ္က ဇ႑	y ပို့ ပ	GAA 1	ວ ຊ ິ່ງວ
-,		STAGA		ဦးများ မ		(၂) (၂) (၂)) ည 🏭 ။	CTG C		ACA C
		ງຄວາ		ပ္ပြဲမြူ မွ			ည် ၁၂၂၂			CAG A
		3939	AGC s	ဂိုင္ ၁၈	(O)			_		AAG (

FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIGURE 1 (suite)

70	995	1087	1206 1325 1444 1563 1682 1801 1920
Acc agt gre cag act tac and cut tat the fat the fat the fat C I s v Q I Y K P R Y C G L C N D G R C	FCC T	ATA	ATT ATG CTG CTG GTA ACT
, , , ,	GAG TIC CGC TGT CCT CAG GGC AAA TIC CTA AAA AAG CCA ATG ATG TIG AIC AAT ACC E F R (C) P Q G K F L K K P M M L I (N) T	AAT GCT TTC TTC CAG CCA TTA GAT CCC ATG TCT AGT GAA GCA AAA ATA TGAAATGTATA N A F F Q P L D P M S S E A K I *	GITTAGGIGGCCCAANAGGIAIGIAGTIIGIACAAANCIIGACCCACAAICAGGIGAATGIAAIAAIIGCAIATAATATGACAAAATATITITATITITITAAACGIAGCCIAAACGIAGCCTITAGGIGGCCTITAGGIGGCCTITAGGIGGCCTITAGGIGGCCTITACAAAGIAIACGIAGCCTITAGAGGGATIAGAGGGAATGCAGGGCCTITAGAAAGIAACAAGCIAACAAAGIAAAAAAAAAA
၌ ပ	AIC	TGAA *	AGTG AGTG ATGA AGCA TAGA
ī a	TIG L	ATA I	TCTG TGAC ATGC ATGC TTTGA TCTG
ž z	ATG M	AAA K	IACAG ITCI IGGGA ITATO
දුල	ATG M	gcA A	FCTAP STIGI SCTTC SAAA SCTCC CAGIC
1	CCA	GAA	ITITI SALIC SALIC SACIO TAGO INGO
် ၁	AAG K	AGT S	SATT NATGO SGAT STTC TAAA
<u>:</u>	AAA K	TCT S	CTGAC NCAGI INATI ITCC NCATI CTTGC
X	CTA L	ATG M	ATATA TTGG TTTT ATTC AATG AGAG
	TTC F	ည	TAAA TACC GGGC TTAA TACA TACA
	AAA K	GAT D	TATG GACT CAAG CAGC GCCT GCCT
Α×	ပ္ပ	TTA L	TGCA ATAA TGTT TGTT CATA AAGT
IAC Y	CAG O	CCA	TAAT AAGG AGCC) TITC TGCA AAGA
ACT	CCT	CAG D	STAA CTTG CTTC NGTT ACTG
cy Cy	වූල	TTC F	GAATO TITTO CCTTO CCTTO GAITO ACCTO
GTG V	ပ္ပင္သ	TIC F	AGGT ATGA ACAG GAGG CAAA AAAA
AGT	IIC F	GCT	AATC GICT TGCC TTAC CICT AATC
ACC T	GAG	AAT N	CCAC AAAT ACCT ACAC CTTT CTTT TAACAC
ဗ္ဗိုစ္ပ	GTT ^	AAC	TGAC CTCC GAGG GAGA ACAA TTGA ATAC
AAC	CAA	AGT	NACT TITA TITA GIGI CCIC TATA NANA
AAG K	ATT I	CAG	ACAAI ITTC IGAGI IAAI IGIA IGIA GCII
TY	ACG	CCT	TTGE GACG TCTC TGAA TATC CGTA
GAA. E	AAA K	P P	IAGT ICAT ITIC ITIC CATI CITC CATI
TTT F	ACC	AAC	IAIG: NGIC: ITIC: GIAI TICI
CGT	AAC	GGT	AAGGT SAGT SAGT TAAA AAAT
GTT	CAC	CAT	CCAAC CCAAC CCAC TCCAC TAAC TAAC
ATG AAA GCI GII CGI III GAA TAC AAG AAC IGC H K A V R F E I K N ©	TGT ACC CCA CAC AAC ACC AAA ACG ATT CAA GTT	TET GTC TGT CAT GGT AAC TGT CCT CAG AGT AAC	GITTAGGIGGCCAAAAGGIAIGIAGITIGIACAAAACITGACCCACAATCAGGIG TITCCIGTAGITIACIAAAIACCICATGACGITICACCCCCCCAAATGICTITAA GAITACAAAGCITCCACAGICTITCTCTCIGAGITTAGAGGACCTIGCCAIGAA TCACAAAAGCITCCACAGITITCACITIGAAIAAIGIGIACAAACACITACACAGG AAITCITCTGGCITAIAAAGIAICITCTATCTGIACCTCTIGACTTTCTCTGAGG TIGATAGCIGATAACAAAITICICATICGIAGCITTAITAGCAGCCTAATCCAAAA GITGIAIGCIAAAAAATITCIGIAAAITCCITIAAAAAAAAAA
XX X	ACC	GTC V	TAGG CCTG TACA CAAA CCAAA CCAAA CCAAA GTAT
ATG M	50	. 50 50	GAT CAT CAT CAT TTG CTT

FIGURE 2



FEUILLE DE REMPLACEMENT

International application No.

PCT/FR 92/00589

Int.Cl.	C12N1/21 G01N33/53:	G01N33/574; C12P	1/68 19/34
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both n	national classification and IPC	
	DS SEARCHED	alsocification symbols	
Minimum do	cumentation searched (classification system followed by	classification symbols)	
Int.Cl			
Documentati	ion searched other than minimum documentation to the ex	tent that such documents are included in th	e fields searched
Electronic da	ata base consulted during the international search (name o	f data base and, where practicable, search t	erms used)
			Į
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where ap	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DE vol. T313, No. III, September		1-41
	FRANCE		
	pages 345 - 351		
•	C. MARTINERIE ET BERNARD PERBAI 'Expression of a gene encoding	a novel	
	potential IGF binding protein :	in human	
	tissues' see the whole document		
	see the whole document		
o,x	Proceedings of the 82nd Annual	Meeting of	1-41
	the American Association for Ca Research Vol. 32	ancer	
	see page 312, abstract No. 185	7	
	& 82nd Annual Meeting of the A	AC	
	May 15-18, 1991, Houston, TX, "Expression of an embryonic g	ene (nov) in	
	nephroblastomas" B. Perbal et	al.	
			
		_/	
Furthe	er documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.	
"A" docume	categories of cited documents: ent defining the general state of the art which is not considered	"T" later document published after the inte date and not in conflict with the appli the principle or theory underlying the	cation but cited to understand
"E" earlier o	f particular relevance document but published on or after the international filing date ent which may throw doubts on priority claim(s) or which is	"X" document of particular relevance; the considered novel or cannot be consi- step when the document is taken alor	dered to involve an inventive
special	o establish the publication date of another citation or other reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the considered to involve an inventive	claimed invention cannot be
"O" documo means	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	combined with one or more other such being obvious to a person skilled in t	documents, such combination
	ent published prior to the international filing date but later than prity date claimed	"&" document member of the same paten	
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sea	rch report
16 Oct	cober 1992 (16.10.92)	2 November 1992 (02.11.9)2)
Name and r	nailing address of the ISA/	Authorized officer	
Europe	ean Patent Office		
Facsimile N	No.	Telephone No.	



International application No.

PCT/FR 92/00589

- 		T
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 12, No. 1, January 1992, WASHINGTON, D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (Nov) in myeloblastosis-associated virus type 1 induced nephroblastomas' see the whole document	Relevant to claim No.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE PCT/FR 92/00589 Demande Internationa I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ? Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB C12Q1/68 CO7K15/00; C12P21/08; 5 C12N15/12; CIB C12P19/34 GO1N33/574: GO1N33/53; C12N1/21; II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultées Symboles de classification Système de classification C07K CIB 5 Documentation consuitée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a port*ê* III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS 10 Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, 2 des passages pertinents 13 No. des revendications viskes 14 Catégorie o 1-41 COMPTES RENDUS DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES P,X vol. T313, no. III, Septembre 1991, PARIS, **FRANCE** pages 345 - 351 C. MARTINERIE ET BERNARD PERBAL Expression of a gene encoding a novel potential IGF binding protein in human tissues' voir le document en entier 1-41 Proceedings of the 82nd Annual Meeting of 0, X the American Association for Cancer Research Vol. 32 voir page 312, Abrégé No. 1857 & 82nd Annual Meeting of the AAC May 15-18, 1991, Houston, TX, USA " Expression of an embryonic gene (nov) in nephroblastomas" B. Perbal et al. -/-document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt International ou à la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention ° Catégories spéciales de documents cités:11 "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendi-"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt internaquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive tional ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revenéication de priorité ou cité pour déterminer la date ée publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "Y" document particulièrement pertinent; l'invention reven-diquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive iorsque le document est associé à un ou "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à plusieurs autres documents de même nature, cette c naison étant évidente pour une personne du métier. une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "&" document qui fait partie de la même famille de brevets IV. CERTIFICATION Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée W2. 11. 92 16 OCTOBRE 1992 Signature du fonctionnaire autorisé

VAN PUTTEN A.J.

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

MOLECULAR AND CELLULAR BIOL vol. 12, no. 1, Janvier 199 D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral and overexpression of a new (Nov) in myeloblastosis-ass type 1 induced nephroblasto voir le document en entier	OGY 2, WASHINGTON, rearrangements cellular gene ociated virus	No. de 1-41	es revendications visées 18
vol. 12, no. 1, Janvier 199 D.C., USA pages 10 - 21 V. JOLIOT ET AL. 'Proviral and overexpression of a new (Nov) in myeloblastosis-ass type 1 induced nephroblasto	2, WASHINGTON, rearrangements cellular gene ociated virus	1-41	
	•		
·			